

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **60-028931**(43)Date of publication of application : **14.02.1985**

(51)Int.Cl.

A61K 35/12(21)Application number : **58-136794**(71)Applicant : **KOKEN KK**
TAJIMA TOMOYUKI
NAGANUSHI YOUICHIROU(22)Date of filing : **28.07.1983**(72)Inventor : **TAJIMA TOMOYUKI****(54) CONCENTRATION OF MULTIPLICATION INHIBITOR FOR MALIGNANT TUMOR CELL OF ANIMAL****(57)Abstract:**

PURPOSE: To concentrate the titled inhibitor, by cultivating a malignant tumor cell of animal, adding serum protein or albumin to a medium of it, cultivating it further, removing the malignant tumor cell, collecting the medium, subjecting it to ultrafiltration with a specific filter.

CONSTITUTION: When a malignant tumor cell of animal is multiplied in a medium for growing it until the medium becomes a saturated state, and it is cultivated in an extracting medium, serum protein or albumin is added to the medium for growing it. The malignant tumor cell is removed from the medium, the medium is collected, it is subjected to ultrafiltration with an amicon filter, and a substance existing in a fraction having $\geq 10,000$ mol.wt. is collected, to give a multiplication inhibitor for malignant tumor cell of animal concentrated by ten and several times (compared with presuggested inhibitor). Since it is concentrated, it provides a malignant tumor cell with excellent inhibitory effect on multiplication with a small dose.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 特許公報(B2)

平3-61649

⑤ Int. Cl.⁹

A 61 K 35/12

識別記号

ADU

庁内整理番号

8615-4C

⑭ 公告

平成3年(1991)9月20日

発明の数 1 (全3頁)

⑬ 発明の名称 ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制剤の濃縮方法

⑮ 特 願 昭58-136794

⑯ 公 開 昭60-28931

⑰ 出 願 昭58(1983)7月28日

⑱ 昭60(1985)2月14日

⑲ 発 明 者 田 島 知 行 千葉県市川市八幡6-5-15
 ⑲ 出 願 人 興 研 株 式 会 社 東京都千代田区四番町7番地
 ⑲ 出 願 人 田 島 知 行 千葉県市川市八幡6-5-15
 ⑲ 出 願 人 長 主 陽 一 朗 神奈川県大和市中央3丁目9-4
 ⑲ 代 理 人 弁 理 士 竹 本 松 司 外1名
 審 査 官 内 藤 伸 一

1

2

⑳ 特許請求の範囲

1 ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を10%新生仔牛血清を添加したベイサルメディアムイーグル(Basal Medium Eagle)を成長用培地として飽和状態になるまで増殖させ、

(a) その後血清を除いて牛血清を添加したベイサルメディアムイーグル抽出培地に移し、30℃～37℃で一週間培養するか、または

(b) そのまま、牛血清又は牛アルブミンを添加し、4℃に24時間放置し、

その後、分子量10000のフィルタで限外濾過し、分子量1万以上の分画を採取することを特徴とするヒト腎細胞癌由来樹立株細胞増殖抑制剤の濃縮方法。

発明の詳細な説明

この発明は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制剤の濃縮方法に関する。

本出願人は、すでに動物の悪性腫瘍細胞の培養後培地より悪性腫瘍細胞を除いて抽出したものからなる動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤を特願昭57-143340号(特開昭59-33223号)として提案した。この悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、正常細胞に対して致死効果がなく、悪性腫瘍細胞に対して増殖抑制や致死効果を特異に有している。

この発明の目的は、より少ない投与量でヒト腎細胞癌由来樹立株細胞に対し、より著しい増殖抑

制効果を有す増殖抑制剤を得るためにこれを濃縮することにある。

本発明のヒト腎細胞癌由来樹立株細胞抑制剤の濃縮方法は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を10%新生仔牛血清を添加したベイサルメディアムイーグル(Basal Medium Eagle)を成長用培地として飽和状態になるまで増殖させ、

(a) その後血清を除いて牛血清を添加したベイサルメディアムイーグル抽出培地に移し、30℃～

10 37℃で一週間培養するか、または

(b) そのまま、牛血清または牛アルブミンを添加し、4℃に24時間放置し、

その後、分子量10000のフィルタで限外濾過し、分子量1万以上の分画を採取することを特徴とす

15 る。

この発明によれば、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞に対する増殖抑制物質が血清またはアルブミンと結合し、結合体として高分子化でき、先に提案した悪性腫瘍細胞の増殖抑制剤と比べ、十数倍に濃縮したヒト腎細胞癌由来樹立株細胞に対する増殖抑制剤を得ることができる。

そして、この発明により得られたヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制剤は十数倍に濃縮しているので、僅かの投与量でヒト腎細胞癌由来樹立株細胞に対し著しい増殖抑制効果を得ることができ

次に、この発明の実施例について述べる。

(実施例 1)

1 使用した細胞

ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRC

2 培養方法

まず、10%新生仔牛血清を添加したBasal Medium Eagle(BME)を成長用培地として用い、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを加え、培養器に飽和状態になるまで、この悪性腫瘍細胞を増殖させる。その後1回洗って血清を除き、これを抽出培地に移し、10%牛新生児血清を添加したBMEにて、30°~37℃の温度条件の下で1週間培養を行なう。

3 採取方法

培養した培地を3000rpm、10minにて遠沈した後、0.45μのミリポアフィルタにて濾過し、悪性腫瘍細胞成分を除去する。次にアミコン社製の分子量10⁴のフィルタを用い1万以上の分画(fr≥10⁴)と1万未満の分画(fr<10⁴)とにわけて採取する。

次に、実施例1の効果を確認するための実験について述べる。

1 悪性腫瘍細胞増殖抑制剤の検定法

15mm径のプラスチックシャーレに入れた10%新生仔牛血清を添加したBEMの培地にヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを10⁴個植え込み、24時間培養した後、前記実施例1の方法で製造された物質を含む培地等の実験用培地と交換し、1日おきに同培地で培地交換を行ない、細胞の増殖状態を6日目に測定する。

限外濾過において、分子量1万以上の分画(fr≥10⁴)に存在する物質を含む培地は、分子量1万以上の分画に存在する物質がかなり濃縮されているので、元の濃度に補正するために10%または20%の新生仔牛血清を添加した。この発明の対照とする分子量1万未満の分画(fr<10⁴)より採取したものを含む培地は、抽出培養時に消費された栄養を補う意味でBMEに含有されているのと同じ成分、濃度のアミノ酸ビタミン、グルコースを添加して栄養的に補正したものに10%または20%新生仔牛血清を添加したものをを用いた。

また、この発明の効果を未処理のものや分子量1万未満の分画より採取したものと比べるために、6日目の培養した悪性腫瘍細胞の生存数を数

え、検定の始めに植えた細胞数に基づき、生存率を百分比で示した。また、比活性は100から生存率を引いて死亡率を求め、死亡率を投与量で割った単位投与量当りの死亡率を算出し、未処理のものを1として比較したものである。

2 実験結果

(表 1)

lot		生存率%	濃縮度	投与量	比活性
lot81	未処理	0.2	1	6.0	1
	fr≥10 ⁴	6.6	17.1	0.35	16.2
	fr<10 ⁴	57	1	6.0	0.43

表1より、この発明により得られたものは先に提案した未処理のものとは比べ、十数倍に濃縮することができ、十数分の一の僅かの投与量で、同様に悪性腫瘍細胞の増殖抑制効果を得ることがわかる。

20 (実施例 2)

1 使用した細胞

ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRC

2 培養方法

まず、10%新生仔牛血清を添加したBasal Medium Eagle(BME)にヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを加え、培養器に飽和状態になるまでこの悪性腫瘍細胞を増殖させる。次に、この培養後培地に適当量の牛血清または牛アルブミンを添加し、4℃の温度条件下で24hrs放置する。

30 3 採取方法

実施例1と同様である。

また、検定法及び実験結果の考察についても実施例1と同様であり、以下に実験結果を表2に示す。

5

(表 2)

lot		生存 率	濃縮 度	投与 量	比活 性
	未処理	1.2	1	6	1
lot101 A	$fr \geq 10^4$	7.2	18.2	0.33	17.1
	$fr < 10^4$	6.7	1	6	1
lot101 B	$fr \geq 10^4$	10.1	20.0	0.30	17.8
	$fr < 10^4$	56	1	6	1

5

10